

**(54) PREPARATION OF LIPOSOME**

(11) 60-7933 (A) (43) 16.1.1985 (19) JP  
 (21) Appl. No. 58-118007 (22) 29.6.1983  
 (71) DAIICHI SEIYAKU K.K. (72) HIROSHI KIKUCHI(1)  
 (51) Int. Cl. B01J13/02, A61K47/00, C07K15/00

**PURPOSE:** To prepare uniform liposome efficiently and in large amt. by stirring liposome membrane composing substance with aq. soln. at a temp. above the phase transfer temp. of the membrane composing substance itself.

**CONSTITUTION:** About 10~1,000pts.wt. aq. soln. such as water is added to 1pt.wt. liposome membrane composing substance such as phosphatidyl choline, etc., and the mixture is stirred at a temp. above the phase transfer temp. of the membrane composing substance itself. If desired medical substance (e.g. penicillin G) is previously added to said aq. soln. in this stage, uniform liposome incorporated with the desired medical substance is prepd. by the above described stirring with good reproducibility and in large amt. Since no org. solvent is used in this method for prepg. liposome, there is no problem in public peace, operational safety, and biological safety. Moreover, the prepn. is performed quite easily requiring only temp. control during preparation. Further, it is possible to prepare liposome preparation having high content of medical substance. Expansion of preparation scale is easy, therefore, commercial production of liposome preparation is possible.

**(54) PREPARATION OF LIPOSOME**

(11) 60-7934 (A) (43) 16.1.1985 (19) JP  
 (21) Appl. No. 58-118008 (22) 29.6.1983  
 (71) DAIICHI SEIYAKU K.K. (72) SADA O HIROTA(1)  
 (51) Int. Cl. B01J13/02, A61K31/60, A61K47/00, C07K15/00

**PURPOSE:** To prepare uniform liposome efficiently and in large amt. by hydrating liposome membrane composing substance by kneading it with a small amt. of aq. solvent at a temp. above the phase transfer temp. of the membrane composing substance.

**CONSTITUTION:** 1pt.wt. liposome membrane composing substance (e.g. phosphatidyl choline) is hydrated by kneading it with ca.0.2~8pts.wt. aq. soln. (e.g. water) at a temp. above the phase transfer temp. of the membrane composing substance. Then, necessary amt. (10~1,000pts.wt.) of aq. soln. is added to the mixture, and obtd. mixture is stirred at a temp. above the phase transfer temp. of the membrane composing substance. As a result, uniform liposome is obtd. efficiently and in a large amt.

**(54) PREPARATION OF MICROCAPSULE**

(11) 60-7935 (A) (43) 16.1.1985 (19) JP  
 (21) Appl. No. 58-118022 (22) 28.6.1983  
 (71) KANZAKI SEISHI K.K. (72) SHIYUNSUKE SHIOI(2)  
 (51) Int. Cl. B01J13/02, B41M5/16

**PURPOSE:** To control the thickness of capsule shell as desired when a hydrophobic core material is covered by polycondensing a material for forming hydrophilic aldehyde resin contained in water by incorporating initial condensation product of hydrophobic aldehyde resin in the core material.

**CONSTITUTION:** A hydrophobic core material is covered by causing polycondensation of materials for forming hydrophilic aldehyde resin (e.g. amines and aldehydes and/or initial condensation product of aminoaldehyde resin). In the process for prepg. microcapsules therefrom, hydrophobic initial condensation product of aldehyde resin (e.g. alkylated product of initial condensation product of aminoaldehyde resin) is incorporated into the above described hydrophobic core material. As the result, capsules having superior preservability for the core material are prepd. with high efficiency while controlling the thickness of the capsule shell as desired.

⑬ 日本国特許庁 (JP)  
⑭ 公開特許公報 (A)

⑮ 特許出願公開  
昭60—7933

⑯ Int. Cl.<sup>4</sup>  
B 01 J 13/02  
A 61 K 47/00  
C 07 K 15/00

識別記号

庁内整理番号  
8317—4G  
7043—4C  
6464—4H

⑰ 公開 昭和60年(1985)1月16日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 7 頁)

⑱ リボソームの製造法

⑲ 特 願 昭58—118007

⑳ 出 願 昭58(1983)6月29日

㉑ 発 明 者 菊池寛

東京都墨田区業平五丁目6番9  
号第一製薬中央研究所製剤研究  
センター内

㉒ 発 明 者 山内仁史

東京都墨田区業平五丁目6番9  
号第一製薬中央研究所製剤研究  
センター内

㉓ 出 願 人 第一製薬株式会社

東京都中央区日本橋3丁目14番  
10号

明 細 書

1. 発明の名称

リボソームの製造法

2. 特許請求の範囲

リボソーム膜成分物質と水性溶液とを、膜成分物質自体の相転移温度以上にて、混拌することとを特徴とするリボソームの製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はリボソームの製造法に関する。

脂質の閉鎖小胞であるリボソームは、広く生体膜のモデルとしてその物理化学的諸性質の研究に利用されてきた。またリボソームはその内部に種々の薬剤を保持することが可能であるために、マイクロカプセルの一極として経口吸収性薬剤の吸収促進、抗癌剤等の細胞内皮系組織へのターゲティング、免疫賦活剤等の活性増強等の応用研究が数多くなされている。リボソームがこれらの研究に盛んに用いられている主な理由は、リボソームの膜構成成分自体が生体由来の脂質であるために毒性が少ないこと、

生体の種々の膜との親和性が高いことなどが挙げられる。一方これらリボソームの製法としては大部分膜成分物質である脂質の溶解剤としてクロロホルム、エーテル、ベンゼン、エタノール、ヘキサン等を用いており、また脂質の可溶化剤としてコール酸、トライトンX-100及びその他の界面活性剤を用いている。従って前者の場合には有機溶媒を減圧、加温、不活性ガスのバブリング等により除去せねばならないし、最終製品中の残留溶媒が問題となる。また、これら調製方法をそのまま工業的生産に結びつけるには保安上及び安全作業上の問題の他、操作技術上の困難さ等がある。更に後者の場合には最終製品から透析またはゲル透過によって用いた界面活性剤を分離除去する必要がある。

有機溶媒あるいは界面活性剤等を用いずにリボソームを調製するものとしては、アニーリング法、凍結融解法の他、特開昭57-88810号及び同57-88811号に示される凍結乾燥法などがある。アニーリング法では、リン脂

質-水分散液をリン脂質の相転移温度( $T_c$ )以下にて超音波照射し、構造欠損(structural defect)を起こしたSU $\bar{V}$ (小さな一枚膜リボソーム)をいったん製し、その後に $T_c$ 以上でインキュベーションして融合させLU $\bar{V}$ (大きな一枚膜リボソーム)を調製する手法をとっている。凍結融解法では、大豆リン脂質に緩衝液を加え20~85℃で20分間超音波照射してSU $\bar{V}$ をいったん製し、次にドライアイス-エタノールで速く凍結し更に室温に戻して融解させ80℃で軽く超音波照射して融合させることによりLU $\bar{V}$ を調製する手法をとっている。また凍結乾燥法ではリン脂質を水性溶液中に分散させた後凍結乾燥し、これを水性溶液中に再分散させることによりリボソームを製するものである。本来リン脂質は水和されて初めてラメラ構造を持ったリボソームになるわけであるが、単なる $T_c$ 以上ではリン脂質はなかなか水性溶液によって水和されず、リボソームもできにくい。従って $T_c$ 付近で適用しても能率、効率の

面で決して優れているとは言えず、又一部の膜成分(質)即ちジセチルホスフェートの如き単独で液晶相を持たない膜成分物質が膜の中に入りにくいなどの欠点がある。

本発明者らはこれらの状況に鑑み、従来その有用性についてはあまり顧みられなかった有機物を全く使用せずにリボソームを調製する方法、即ちただ単に脂質を水性溶液中に分散させる方法に注目し、その改良について鋭意検討した結果、リボソームを構成する通常の膜成分物質と水性溶液とを混ぜて懸濁させ攪拌する際、従来言われていた脂質が水和したラメラ相(2分子膜)での相転移温度( $T_c$ )ではなく、粉末結晶としての相転移温度( $T_\alpha$ )以上にて行うことにより( $T_\alpha > T_c$ )均一なリボソームを効率良くしかも大量に製することができることを見出し、本発明を完成するに至った。一般に中性脂質であるホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、ホスファチジルエタノールアミンの場合、その脂肪酸鎖長や不飽和度によらず固

体としての融点は高く各々230, 205, 190℃であることが知られている。しかしながら実際にはこれら固体としての融点よりはるかに低い温度にて、これらの脂質は吸熱的な相変化をし、脂肪酸鎖の部分が溶けて液体状態になる。即ち液晶へと相変化することが知られている。例えばジバシトイルホスファチジルコリンの場合には、ラメラ相(2分子膜)の状態では41℃に相転移温度がある。この温度がよくいわれる脂質の相転移温度( $T_c$ )であるが、これは脂質が水の中で完全に水和され(1分子1分子に対し10分子の水が水和し、それ以上の水は自由水となる)でラメラ相(2分子膜)を形成しているときの相転移温度を意味している。ジバシトイルホスファチジルコリンの場合、水和した状態即ちラメラ相(2分子膜)の状態では相転移温度は41℃にあるが、粉末結晶状態では65℃(1水和物結晶)あるいは88℃(無水物結晶)に相転移温度が存在する。そしてただ単にリン脂質を水性溶液中に

分散させ温度を単に $T_c$ 以上にしても、水界面と接したリン脂質は水和されてこの温度で流動性を持つてはいるが、粉末結晶内部のリン脂質は水和されず固体状態にあるといえる。ここで攪拌等の機械的振動を与えると水界面と接し水和されたリン脂質だけが水性溶液中にリボソームとして分散していくことになる。

このように単なる $T_c$ 以上で行う従来の方法は、粉末結晶状態のリン脂質-水界面で徐々にラメラ構造(2分子膜)を生成させ小胞化させていくという方法であるがために、能率、効率の面で優れた方法とは言いがたい。これに対し本発明によれば、リン脂質の粉末結晶状態即ち無水物結晶あるいは1水和物結晶としての相転移温度( $T_\alpha$ )に注目して行うために能率、効率の面で上述の方法よりはるかに優れている。即ち $T_\alpha$ 以上では水性溶液中に粉末結晶状態で分散しているリン脂質は、水界面のリン脂質ばかりでなく内部のリン脂質も液体状態にあるために非常に水和されやすい状態にある。ここで

振拌等の機械的振動を与えてやれば内部のリン脂質も同時に水和されながらリボソーム化して水性溶媒中に分散していくことになる。かかる新知見に基いてなされたのが本発明である。

本発明において使用される膜成分物質としては、例えばホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、卵黄レシチン、大豆レシチン等に代表されるリン脂質の他、糖脂質、ジアルキル型合成界面活性剤等の一種又は二種以上の混合物が主体となる。なお、これに膜安定化剤としてコレスタン、コレステロール等のステロール類を、荷電物質としてジセチルホスフェート、ホスファチジン酸、ガンマリオンシド、ステアリルアミン等を、更に酸化防止剤として $\alpha$ -トコフェロール等を加えて膜成分物質を形成させてもよい。

これらリボソーム製剤の膜成分物質の比率は何ら限定されるべきものではないが、好ましく

は脂質1重量部に対しステロール類を0~8重量部程度、荷電物質を0.1重量部程度加えるのが適している。

また膜成分物質を分散させる水性溶媒としては、水、生理食塩水、緩衝液、糖類の水溶液及びこれらの混合液等が好ましく使用される。

膜成分物質との使用比率は膜成分物質1重量部に対し、10~1000重量部程度が適当である。

本発明のリボソームに保持させる薬剤としては、特に制限はないがサイトシンアラビノシド、メトトレキサートに代表される抗癌剤、ペニシリンGに代表される抗生物質、インシュリン、インターフェロン、グルコアミラーゼに代表されるたんぱく質、デキストランに代表される多糖類、DNA、RNAの如き核酸類、ビタミンAに代表されるビタミン類などの他、サリチル酸ナトリウムのような一般薬剤が用いられ、一般にはこれ等は水性溶媒に溶解して用いる。

本発明にもとづいてリボソーム製剤を調する

には以下の如き手順によれば良い。

まず用いる膜成分物質自体の粉末結晶としての相転移温度( $T_\alpha$ )を求めるが、一般に示差相熱分析(DSC)による熱的分析が速くて簡便である。

ここで用いる膜成分物質自体とは、無水物結晶状態であれ1水和物結晶状態であれ限定はされないが、一般には無水のリン脂質は吸湿性が強く容易に1水和物を形成してしまうことが知られている。ここでいう粉末結晶としての相転移温度( $T_\alpha$ )は、卵黄レシチン、スフィンゴミエリンに代表される単独で液晶相をもつ脂質の場合には脂肪酸鎖の部分が液体状態になる、即ち、液晶へ相変化する温度を意味し、固体としての融点( $mp$ )を意味しているのではない( $T_c < T_\alpha \ll mp$ )。また、ステアリルアミン、ジセチルホスフェート、コレスタンに代表される単独では液晶相をもたない脂質の場合には、いわゆる固体としての融点( $mp$ )を意味している。DSCの測定における昇温速度は2~

4 $^{\circ}$ /minが適当であり、各々得られたピークの補外開始温度を相転移温度( $T_\alpha$ )とすれば良い。

次に所定量の薬剤を含有する水性溶媒をとり、あらかじめ膜成分物質の粉末結晶としての相転移温度( $T_\alpha$ )以上に加熱しておく。ここで膜成分物質として何種類かを混合して用いる場合には、用いる膜成分物質の中で最も粉末結晶としての相転移温度( $T_\alpha$ )が高いものに合わせることを望ましい。

従来のただ単に脂質の $T_c$ 以上に加熱する方法では、このステアリルアミン、ジセチルホスフェートの如き単独で液晶相を持たない膜成分物質が無視されており、従って、ジセチルホスフェートのような高い融点( $70^{\circ}$ )の物質が、例えばジバシメチルホスファチジルコリン( $T_c = 41^{\circ}$ )と共に処方された場合、リボソームの膜の中に入りにくかった理由がここにあると考えられる。

次にこの水性溶媒中に所定量の膜成分物質を

加えると、膜成分物質はすぐに水性溶媒中に膨潤し始める。この時攪拌操作を行うことにより、薬剤を保持した均一のリボソームが再現性良く得られることになる。この膨潤、攪拌操作も  $T_m$  以上で行うが、この水性溶媒と膜成分物質の混合においては、添加順序は任意である。

この攪拌においては攪拌機の選択によりできるリボソームの粒径は影響を受けやすい。即ちプロペラミキサーの如く比較的緩和な攪拌機を用いた場合には大きな粒径のリボソームができやすいし、ホモミキサーの如く比較的せん断力の強い攪拌機を用いた場合には、小さな粒径のリボソームができやすい。また更に小さな粒径のリボソームを製するには超音波乳化機、高压乳化機等を用いるのも良いし、径を均一にするため限外濾過膜法、例えばポリカーボネート型メンブラン・フィルターによって粒径分布をコントロールすることも可能である。

なお、同一処方内で薬剤のリボソームへの保持率を高めるには保持させる薬剤を少量の水性

溶媒に溶かしこみ、これをまず膜成分物質との混合に用いて、後に残りの水性溶媒を加えて希釈した方がよい。

このようにして薬剤を保持した均一粒径のリボソーム製剤が再現性良く、しかも大量に得ることもできるが、このリボソーム製剤はこのまま使用しても良く、また透析、ゲル濾過、遠心分離等の手段によりリボソームに保持されなかった薬剤を分離除去して使用しても良い。

既知のリボソーム調製法に比して本発明法が優れているところは次の点である。

- 1) 有機溶媒をいっさい使わずにリボソームの調製が可能である。従って、保安上、安全作業上、及び生物学的安全性上問題ない。
- 2) 製造は非常に簡便で、特別な装置や操作技術は必要としない。
- 3) 調製時の温度制御に留意するのみで良い。
- 4) 薬剤の保持率の高いリボソーム製剤が得られる。
- 5) スケールアップが容易であり、リボソーム

製剤の工業的生産が可能である。

- 5) 膜成分物質の中で一部使いにくいものもあるが(例えばコレステロールは融点が  $148^\circ\text{C}$  と高く、温度制御だけで膜の構成成分の一部として入れるには無理がある。この場合、コレステランなどの融点の低いステロール類によって代用が可能である。)、ほとんどの脂質で調製可能である。従来の  $T_m$  以上でただ単にリン脂質粉末結晶を大量の水性溶媒中で攪拌する方法では、ジセチルホスフェートの如き単独で液晶相を持たない膜成分物質が膜の中に入りにくいという欠点があったが、本発明によれば容易に膜中に入れることができる。次に実施例により本発明を例示するが、これらの実施例は何ら本発明を限定するものではない。

#### 実施例 1

市販の  $L-\alpha$ -ジミリスチルホスファテジルコリン ( $L-\alpha$ -DMPC, 純度 98%,  $T_m = 23.8^\circ\text{C}$ ) を粉末結晶状態のまま熱的分析

(DSC) にかけて  $T_m$  を求めたところ  $45.0^\circ\text{C}$  (昇温速度  $40^\circ\text{C}/\text{min}$ ) であった。

次にリボソームに保持させるモデル薬物としてグルコースを選び、 $0.28\text{M}$  グルコース水溶液  $5.0\text{ml}$  を水浴上  $55.0^\circ\text{C}$  ( $>T_m$ ) に加熱した。ここに上記  $L-\alpha$ -DMPC  $0.79\text{g}$  を加え攪拌し均一に膨潤せしめた後、 $5.0 \sim 55.0^\circ\text{C}$  ( $>T_m$ ) にてホモミキサーにより 2 分間攪拌し室温に戻したところ、グルコースを保持した乳白色のリボソーム懸濁液が得られた。

このリボソーム懸濁液  $0.5\text{ml}$  をとりセフデックス G-50 を用いてゲル濾過 ( $1\text{cm}\phi \times 18\text{cm}$ , 生理食塩水  $50^\circ\text{C}$ ) し、リボソームに保持されなかったグルコースを分離除去した。次いでリボソーム固分のグルコースを常法に従って、油/水 分配により水層中に抽出し定量したところ、保持率は 88% であった。

またゲル濾過して得たリボソーム固分を光

光学顕微鏡(日本光学、広視野顕微鏡)により観察したところ、粒径 $1\mu\text{m}$ 前後の均一な球状を呈していた。更に遠心分離を行い、得られた沈殿物につきD80による熱測定を行ったところ、 $28^{\circ}\text{C}$ ( $-T_c$ )付近にピークが認められた。

#### 比較例1

実施例1と同一の処方で行い、グルコース水溶液の加温は $30^{\circ}\text{C}$ ( $>T_c$ かつ $<T_a$ )、攪拌は $35\sim 30^{\circ}\text{C}$ ( $>T_c$ かつ $<T_a$ )で行った。ホモミキサーによる攪拌8分間では試料は均一に分散せず、攪拌を中断すると沈殿物及び浮遊物が認められたことから、リボソームが完全にはできていないものと判断された。攪拌1時間後、均一な乳白色のリボソーム懸濁液が得られ、この液を室温に戻した後その $0.5\text{ml}$ をとり実施例1と同様にゲル濾過を行ったところ、その保持率は $5.1\%$ であった。

#### 実施例2

市販のL- $\alpha$ -ジベルミトイルホスファチジルコリン(L- $\alpha$ -DPPC、シグマ、純度

溶液の加温は $45^{\circ}\text{C}$ ( $>T_c$ かつ $<T_a$ )、攪拌は $40\sim 45^{\circ}\text{C}$ ( $>T_c$ かつ $<T_a$ )で行った。ホモミキサーによる攪拌8分間では試料は均一に分散せず、室温に戻したところ沈殿物及び浮遊物が認められたことから、リボソームが完全にはできていないものと判断された。攪拌1時間後、均一な乳白色のリボソーム懸濁液が得られ、この液を室温に戻した後その $0.5\text{ml}$ をとり実施例2と同様にゲル濾過を行ったところ、その保持率は $10.4\%$ であった。

#### 実施例3

市販のDL- $\alpha$ -ジベルミトイルホスファチジルコリン(DL- $\alpha$ -DPPC、純度 $99\%$ 、 $T_c=41^{\circ}\text{C}$ )の粉末結晶状態での $T_a$ をD80により求めたところ $62^{\circ}\text{C}$ (昇温速度 $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )であった。同様にステアリンアミン(SA)についてその融点( $T_a$ )を求めたところ $41^{\circ}\text{C}$ であった。従ってこの系の $T_a$ を $62^{\circ}\text{C}$ ( $-T_a$ )とした。

次に $0.28\text{M}$ グルコース水溶液 $50\text{ml}$ を

$98\%$ 、 $T_c=41^{\circ}\text{C}$ )の粉末結晶状態での $T_a$ をD80により求めたところ $54^{\circ}\text{C}$ (昇温速度 $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )であった。

このL- $\alpha$ -DPPC  $1.0\text{g}$ に、あらかじめ $65^{\circ}\text{C}$ ( $>T_a$ )に保温した $0.28\text{M}$ グルコース水溶液 $50\text{ml}$ を加えた後、 $60\sim 65^{\circ}\text{C}$ ( $>T_a$ )にてホモミキサーにより8分間攪拌し室温に戻したところ、グルコースを保持した乳白色のリボソーム懸濁液が得られた。

このリボソーム懸濁液 $0.5\text{ml}$ をとり実施例1と同様にゲル濾過(ただし室温)を行ったところ、その保持率は $14.0\%$ であった。

またゲル濾過して得たリボソーム固分を広視野光学顕微鏡により観察したところ、粒径 $1\mu\text{m}$ 前後の均一な球状を呈していた。更に遠心分離を行い、得られた沈殿物につきD80による熱測定を行ったところ、 $41^{\circ}\text{C}$ ( $-T_c$ )付近にピークが認められた。

#### 比較例2

実施例2と同一の処方で行い、グルコース水

$100\text{ml}$ ビーカーにとり水浴にて $75^{\circ}\text{C}$ ( $>T_a$ )に加温した。ここに上記DL- $\alpha$ -DPPC  $1.0\text{g}$ 及びSA $40\text{mg}$ を加え攪拌し均一に溶解せしめた後、 $70\sim 75^{\circ}\text{C}$ ( $>T_a$ )にてホモミキサーにより8分間攪拌し室温に戻したところ、グルコースを保持した乳白色のリボソーム懸濁液が得られた。このリボソーム懸濁液 $0.5\text{ml}$ をとり実施例2と同様にゲル濾過を行ったところ、その保持率は $15.2\%$ であった。

またゲル濾過して得たリボソーム固分を広視野光学顕微鏡により観察したところ、粒径 $1\mu\text{m}$ 前後の均一な粒状を呈していた。

#### 比較例3

実施例3と同一の処方で行い、グルコース水溶液の加温は $45^{\circ}\text{C}$ ( $>T_c$ 、 $T_a$ かつ $<T_a$ )、攪拌は $41\sim 45^{\circ}\text{C}$ ( $>T_c$ 、 $T_a$ かつ $<T_a$ )で行った。ホモミキサーによる攪拌8分間では試料は均一には分散せず、攪拌を止めると沈殿物及び浮遊物が認められたことから、リボソームは完全にはできていないものと判断された。

次に攪拌温度を $50\sim 55^{\circ}\text{C}$ ( $>T_c$ 、 $T_a$ 、

かつ $T\alpha_1$ )に上げて更に攪拌を8分間行ったところ乳白色の懸濁液が得られた。しかしながらこの懸濁液を室温に戻した後、その0.5mlをとり実施例3と同様にゲル濾過を行ったところ試料の一部が注入口付近にとどまっていた。カラムを通過したリボソーム成分につきグルコースの保持率を求めたところ8.5%であった。

実施例4

膜成分物質として実施例3と同じDL- $\alpha$ -DPPC( $T_c=41^\circ$ ,  $T\alpha_1=88^\circ$ )を用い、更にジセチルホスフェート(DOP)についてDSCによりその融点( $T\alpha_2$ )を求めたところ $70^\circ$ (昇温速度 $4^\circ/\text{min}$ )であった。従ってこの系の $T\alpha$ を $70^\circ$ ( $-T\alpha_2$ )とした。

0.28Mグルコース水溶液50mlを水浴上 $75^\circ$ ( $>T\alpha$ )に加温した。ここにDL- $\alpha$ -DPPC 0.9g及びDOP 5.5gを加え攪拌し均一に膨潤せしめた後、 $70\sim 75^\circ$ ( $>T\alpha$ )にてホモミキサーにより8分間攪拌し室温に戻したところ、グルコースを保持した乳白色

のリボソーム懸濁液が得られた。

このリボソーム懸濁液0.5mlをとり実施例3と同様にゲル濾過を行ったところ、その保持率は18.8%であった。

#### 比較例4

実施例4と同一の処方で行い、グルコース水溶液の加温及び攪拌は $85^\circ$ 前後( $>T_c$ ,  $T\alpha_1$ かつ $T\alpha_2$ )で行った。ホモミキサーによる攪拌を80分間行ったが、乳白色の懸濁液が得られるものの、懸濁液中にDOPと思われる白色結晶が多く認められ、室温に戻して放置したところ沈降した。これはこの温度での条件ではDL- $\alpha$ -DPPCは水和されてリボソーム化するが、荷電物質であるDOPはその融点( $T\alpha_2$ )が高いため、膜を構成する一成分となるに至らなかったためであることが示唆された。

この懸濁液の上層を0.5mlとり、実施例3と同様にゲル濾過を行ったところその保持率は8.9%であった。

#### 実施例5

完全水添精製卵黄レシチン(IV-1, リン脂質99%以上,  $T_c=45\sim 60^\circ$ ,  $T_{max}=52^\circ$ )の粉末結晶状態での $T\alpha_1$ をDSCにより求めたところ $67^\circ$ (昇温速度 $4^\circ/\text{min}$ )であった。また荷電物質としてはジセチルホスフェート(DOP,  $T\alpha_2=70^\circ$ )を用いることとし、この系の $T\alpha$ を $70^\circ$ ( $-T\alpha_2$ )とした。

次に上記完全水添精製卵黄レシチン11.0g及びDOP 8.0gをあらかじめ $75^\circ$ ( $>T\alpha$ )に保温した0.28Mグルコース水溶液800mlを加えた後、 $70\sim 75^\circ$ ( $>T\alpha$ )にてホモミキサーにより8分間攪拌し室温に戻したところ、グルコースを保持した乳白色のリボソーム懸濁液が得られた。

このリボソーム懸濁液0.5mlをとり実施例3と同様にゲル濾過を行ったところ、その保持率は28.0%であった。

#### 比較例5

実施例5と同一の処方で行い、グルコース水溶液の加温及び攪拌は $60\sim 65^\circ$ ( $>T_c$ ,  $<T\alpha_1$ ,  $T\alpha$ )で行った。ホモミキサーによる攪拌を80分間行ったが、比較例4と同様懸濁液中にDOPと思われる白色結晶が多く認められ、室温に戻して放置したところ沈降した。

比較例4と同様、この懸濁液の上層を0.5mlとり実施例2と同様にゲル濾過を行ったところその保持率は10.0%であった。

#### 実施例6

実施例5と同様にして0.28Mグルコース水溶液の代わりに1%デキストランT40生理食塩水溶液を、ホモミキサーの代わりにプロベラミキサーを用いて調製したところ、デキストランT40を保持した乳白色のリボソーム懸濁液が得られた。

このリボソーム懸濁液1mlをとりセファローズOL-4Bを用いてゲル濾過(2.8cm $\phi$ ×4.2cm、生理食塩水)し、リボソームに保持さ

れなかったデキストランT40を分層除去した。  
次いでリボソーム固分のデキストランT40を  
常法に従って 油/水 分配により水層中に抽  
出し定置したところ、保持率は81.8%であ  
った。

#### 実施例7

実施例6と同一処方で行ったが、デキスト  
ランT40は高濃度生理食塩水溶液で添加し、こ  
の段階で攪拌してリボソームを調製し、その後  
残りの生理食塩水を加えて希釈、攪拌した。即  
ち実施例6と同様にまず完全水添精製卵黄レシ  
チン11.0g及びDCP820mgをとり、あら  
かじめ75℃(>T<sub>α</sub>)に保温した8%デキスト  
ランT40生理食塩水溶液150mlを加えた後  
70~75℃(>T<sub>α</sub>)にてプロベラミキサーに  
より8分間攪拌した。この液を室温に戻した後、  
更に生理食塩水150mlを加えて室温にてプロ  
ベラミキサーにより8分間攪拌したところ、デ  
キストランT40を保持した乳白色のリボソ  
ーム懸濁液が得られた。

このリボソーム懸濁液1mlをとり実施例6と  
同様にゲル透過を行ったところ、その保持率は  
89.7%であった。